

サルコイドーシス, 特発性間質性肺炎における BALF 細胞の特徴

雨 夜 和 俊

札幌医科大学内科学第3講座 (主任 鈴木 明 教授)

Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid Cells in Patients with Pulmonary Sarcoidosis and Idiopathic Interstitial Pneumonia

Masatoshi AMAYA

Department of Internal Medicine (Section 3), Sapporo Medical College

(Chif : Prof. A. SUZUKI)

ABSTRACT Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed in 41 patients with pulmonary sarcoidosis (SAR), 19 patients with idiopathic interstitial pneumonia (IIP), and 24 healthy volunteers (HV) in order to make comparisons based on smoking degree. These three groups were classified as non smokers (NS), light smokers (LS), and heavy smokers (HS). In HV, NS were 13 cases, LS were 6 cases, and HS were 5 cases. In SAR, there were 24 cases, 12 cases and 5 cases of NS, LS and HS respectively. In IIP, there were 5 NS cases, 14 HS cases, but no LS cases.

There were significant differences in total cell number (TCN), differential cell findings and T cell subsets between NS and HS in both SAR and HV. However there were no significant differences between NS and LS in either SAR or HV. There were significant differences in recovery rate (RR) and TCN between NS and HS in IIP, however there were no significant differences in cell differentiation nor T cell subsets between NS and HS.

The BALF cells' characteristics of each disease group were investigated in terms of each smoking degree as compared with HV. For those characteristics which increased, the rates of those patients deviating more than the mean+2 S. D. of HV's BALF findings were defined as having a positive ratio. For those characteristics which decreased, the rates deviating less than the mean-2 S. D. of HV's BALF findings were considered a positive ratio. The positive ratios decreased in terms of smoking degree in SAR, however high positive ratios increased in HS of IIP.

BALF cells findings were investigated in relation to the degree of disease activity. The value of S-ACE and patients' symptoms were characteristic of disease activity in SAR. HLA-DR positive lymphocytes were more related to the disease activity than TCN, Ly or CD4/CD8 ratio.

In the comparison between HLA-DR positive lymphocyte numbers and T cell subset numbers, HLA-DR positive lymphocytes in SAR were dominant for CD4 antigen, however that was not the result in IIP.

Abbreviations:

BALF : bronchoalveolar lavage fluid.

TCN : total cell number.

Ly : lymphocyte.

SAR : pulmonary sarcoidosis.

NS : non smokers.

HS : heavy smokers.

S-ACE : serum angiotensin converting enzyme

RR : recovery rate.

PAM : pulmonary alveolar macrophage.

PMN : polymorphonuclear leukocyte.

IIP : idiopathic interstitial pneumonia.

LS : light smokers.

2', 5' AS : 2', 5' oligoadenylate synthetase

2', 5' Oligoadenylate synthetase was measured in BALF cells of HV, IIP and SAR. The activity of this enzyme was elevated in the 3 groups, particularly in SAR. This means that interferon exists in the bronchoalveolar area. (Received November 13, 1990 and accepted November 28, 1990)

Key words: Bronchoalveolar lavage (BAL), Pulmonary sarcoidosis, Idiopathic interstitial pneumonia, smoking, 2', 5' oligoadenylate synthetase

1 緒 言

Reynolds and Newball¹⁾ (1974 年)によって開発された気管支肺胞洗浄法 (Bronchoalveolar lavage: BAL) は、肺局所に直接アプローチし、そこに存在する細胞成分や液性成分を取り出し、従来とは異なる局所の様相の解析を可能にした点で極めて画期的な方法である。またこの方法は生検に比べ患者に対する侵襲が少なく、合併症の頻度も少ないため繰り返し施行できる利点がある。80 年代になるとフローサイトメトリー²⁾とモノクローナル抗体の開発によりリンパ球サブセットの識別が可能になり、各種呼吸器疾患、特にびまん性間質性肺疾患の病因、病変成立過程での病態と免疫学的な役割が次第に明らかになってきた²⁻⁷⁾。しかし BAL 液 (BAL fluid: BALF) の細胞分画^{8,9)}ならびにリンパ球サブセット^{10,11)}は疾患のみならず喫煙によっても大きな影響を受けることが明らかにされ、近年健康者 (Healthy volunteers: HV) ならびに各種肺疾患における BALF 細胞成分に対する喫煙の影響について再検討が進められつつある。これらの一環として今回は喫煙の程度が BALF の細胞成分ならびに診断能に及ぼす影響を知ることを目的として、HV、肺サルコイドーシス (Pulmonary sarcoidosis: SAR) 患者、および特発性間質性肺炎 (Idiopathic interstitial pneumonia: IIP) 患者について BALF 細胞の特徴を検討した。

一方、マクロファージ、リンパ球から産生される種々の mediator がこれら疾患の病態に深く関わっている。Interferon (IFN) もその一つであり、最近 SAR、IIP 等呼吸器疾患の BALF 細胞から IFN が分泌されているとの報告を散見する^{12,13)}。2', 5' oligoadenylate synthetase (2', 5' AS) は IFN 力価を反映するとされているので¹⁴⁾、HV、SAR、IIP の BALF 細胞についてその活性値を測定、分析した。

2 研究対象および方法

2.1 研究対象

対象は HV 24 名 (21~47 歳: 平均年齢 27.8 歳)、SAR 患者 41 名 (14~67 歳: 平均年齢 35.2 歳)、IIP

患者 19 名 (45~77 歳: 平均年齢 61.5 歳) である (Table 1)。疾患の診断は SAR は組織診断が得られた症例であり、IIP は厚生省特定疾患の診断基準に準じて診断した症例である。これら対象者を喫煙の有無により、現在および過去に喫煙習慣のなかったものを非喫煙者 (Non smokers: NS)、現在も喫煙習慣のある一日の喫煙本数 15 本未満のものを軽度喫煙者 (Light smokers: LS)、一日の喫煙本数が 15 本以上のものを高度喫煙者 (Heavy smokers: HS) とした。以前喫煙し、現在禁煙している者 (Ex-smoker) は含んでいない。この分類により HV 24 名は、NS 13 名、LS 6 名、HS 5 名である。SAR 患者では NS 24 名、LS 12 名、HS 5 名、IIP 患者では NS 5 名、LS はいなくて HS 14 名である。なお SAR は NS、LS、HS 間で胸部 X 線所見上、両側肺門リンパ節腫脹のみの群と肺野病変を有する群の割合はほぼ同等であり、血清 ACE (S-ACE) 値についても差を認めない。IIP は NS、HS 間で動脈血ガス分析、肺拡散能に差を認めない症例である。

2.2 方 法

2.2.1 BAL の手技

BAL は flexible broncho-fiberscope (オリンパス社製 4 B 2) を用い、被検者の中葉ないし舌区の亜区域枝にその先端を楔入し、注射筒を使い温生食 50 ml を用手下に 4 回、注入吸引を繰り返した¹⁵⁾。温生食の総注入量は 200 ml であった。

2.2.2 BALF 細胞の分析方法

2.2.2.1 回収率 (Recovery rate: RR) ならびに総細胞数 (Total cell numbers: TCN) の算定

吸引した BALF 容量を総注入量 200 ml で除し、RR とした。BALF を 250×g、4℃、10 分間遠心し、沈渣中の細胞を Eagle's MEM に浮遊した。Burker-Turk 計算盤を用い細胞数を求め、BALF の容量で除して BALF 1.0 ml 当りの細胞数を得、これを TCN とした。次に細胞濃度を 5×10^6 個/ml に調整した。

2.2.2.2 細胞分画標本作製法

Filter 法^{16,17)}を用いて以下のようにして作製した。ガラス製フィルターホルダー (Millipore Co., Ltd., Cat.

Table 1 Summary of healthy volunteers, pulmonary sarcoidosis patients and patients with idiopathic interstitial pneumonia.

	Cases	Age	Sex (F/M)		
Healthy volunteers (HV)					
Non smokers	13	26.4±3.7	3/10		
Light smokers	6	28.5±6.9	0/6		
Heavy smokers	5	27.4±1.3	0/5		
Pulmonary sarcoidosis (SAR)					
				Chest X-ray (I/II)	S-ACE (IU/ml)
Non smokers	24	39.0±16.7	18/6	10/14	21.2± 8.9
Light smokers	12	26.1±12.0	4/8	4/8	23.9±10.7
Heavy smokers	5	37.0±13.1	3/2	2/3	23.7± 8.9
Idiopathic interstitial pneumonia (IIP)					
				PaO ₂ (torr)	%DL _{co}
Non smokers	5	61.2±11.4	4/1	75.9±6.0	39.7± 8.3
Heavy smokers	14	58.5±13.4	2/12	76.9±10.6	41.8± 7.3

The findings of chest X-ray in SAR were classified into 2 groups

I: Bilateral hilar lymphadenopathy (BHL) II: abnormal shadow in lung field with or without BHL

No. XX 1504700)に, 95%エチルアルコールで予備膨化を施したメンブレンフィルター(Millipore Co., Ltd., Pore size 5.0 μ m, 直径 47 mm, Cat. No. SM WP 04700)をセットし生食 100 ml を funnel 内に注いだ. 次に生食内に 5 \times 10⁶ 個/ml の濃度に調整された細胞浮遊液 50 μ l を加え軽くピペッティングし真空ポンプを用いず自然滴下させた. 液面がメンブレンフィルター上, 約 1 cm になった時点で 95%エチルアルコール 20 ml を静かに加え, そのまま約 1 分間放置し, 予備固定を行った. エチルアルコールが完全にろ過された時点で直ちにメンブレンフィルターをホルダーからはずし 95%エチルアルコール溶液に浸し 15 分間固定を行った. 固定終了後, Table 2 に示した操作に従って hematoxylin-eosin 染色を行った. 染色過程でメンブレンフィルターは色調が変化するが, 最終的にはキシレンにより透明化する. 透明化したメンブレンフィルターはカバーガラスに収まる程度の大きさにするため, シャーレ内で裁断し, Eukitt (O. Kindler, Germany) に浸す. 約 15 分間放置した後メンブレンフィルターを取り出し余分な Eukitt を十分落とし, スライドガラス上に載せ, 軽くカバーガラスを載せる. 以上の方法で細胞分画標本を作製し, 光学顕微鏡を用いて, 1000 倍で 500 個以上の細胞をカウントし肺胞マクロファージ(Pulmonary alveolar macrophage: PAM), リンパ球(Lymphocyte: Ly), 多核型白血球 (Polymorphonuclear leukocyte: PMN)の比率を算定した. PMN には好中球, 好酸球の両者を含めた.

2.2.2.3 リンパ球サブセットの測定

T 細胞の分析に抗 CD3 抗体, 抗 CD 4 抗体, 抗 CD 8 抗体 (以上 Ortho 社製)を用いた. 活性化 T 細胞, 汎 B 細胞を認識する抗体として HLA-DR 抗体, 抗 CD19 抗体 (以上 Coulter 社製)をそれぞれ用いた.

Table 2 Hematoxylin-eosin staining using the filter method

	Step	Time (min)
1	95% ethyl alcohol	over 15
2	70% ethyl alcohol	2
3	50% ethyl alcohol	2
4	Distilled water	2
5	Hematoxylin	1
6	Distilled water	4
7	0.05% HCl	2
8	Distilled water	4
9	Eosin	0.5
10	70% ethyl alcohol	2
11	95% ethyl alcohol	6
12	100% propyl alcohol	2
13	Xylen-propyl alcohol	2
14	Xylen	over 5
15	Eukit	15

Each reagent was poured into a dish of 90mm diameter and a membrane filter was immersed in the reagents in regular sequence.

Gill's hematoxylin was diluted with distilled water to 50% and picro eosin was diluted with distilled water to 30% for our experiment.

5×10⁵ 個の BALF 細胞を上記抗体で 4℃, 暗所で 30 分間反応させ, PBS で 2 度洗浄した。次に FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Coulter 社製) で標識し, 4℃, 暗所で 30 分間反応させた。その後 PBS で 2 度洗浄した。陽性リンパ球の測定には flow-cytometry (Ortho Spectrum III) を用いて, forward scatter および side scatter により, リンパ球集団に gate を設置し, fluorescence を計測し, 陽性細胞の比率を算出した。

2・2・2・4 リンパ球サブセット数の計算

2・2・2・1 で得た TCN にリンパ球比率を乗じ, さらに CD4, CD8, HLA-DR 各抗原の陽性細胞の比率を乗じて, 各々の phenotype の BALF ml 当りの細胞数を得た。

CD4 陽性 (CD4⁺) 細胞数

= 総細胞数 × リンパ球比率 × CD4⁺ 細胞比率

CD8⁺ 細胞数

= 総細胞数 × リンパ球比率 × CD8⁺ 細胞比率

HLA-DR⁺ リンパ球数

= 総細胞数 × リンパ球比率 × HLA-DR⁺ リンパ球比率

2・2・3 2', 5' AS ならびに S-ACE の測定

BALF 細胞は PBS および MEPS buffer で洗浄した後, PBS で 3×10⁶/ml に再浮遊後, NP40 lysate buffer (pH7.5, 20 mM HEPES, 5mM MgCl₂, 120mM KCl, 1mM DTT, 10% glycerol, 0.5% NP40) 60 μl で 10 分間可溶化し, 10,000 rpm, 10 分間遠心した後の上清を粗酵素標品とした。蛋白量は, Bio Rad 社製の蛋白測定キットにより測定した。酵素

反応は, 反応液 {10 mM HEPES buffer (pH 7.4), 90 mM CH₃COOK, 25 mM (CH₃COO)₂Mg, 5 mM ATP, 4 mM fructose-1,6-biphosphate, 1 mM DTT, 200 μg/ml poly I: poly C, [³H]ATP 1.25 μCi} に粗酵素標品 10 μg を加え, 50 μl とし, 33℃, 4 時間反応させた後, 95℃, 2 分間加熱し, 90 mM KCl, 20 mM TRIS-HCl buffer (pH 7.6) 1 ml を加え, 3,000 rpm, 5 分間遠心し, 上清を DEAE-cellulose カラムにかけ, 90 mM KCl, 100 mM KCl で未反応の ATP を溶出した後, 350 mM KCl 溶出画分に PCS (Amersham) を加え放射活性を測定した。酵素活性は n mole/mg/hour で表した。

S-ACE の値は笠原法¹⁸⁾ で測定した。

2・2・4 統計的处理

測定値は平均値 ± 標準偏差 (mean ± S. D.) で表した。有意差の検定は Wilcoxon's non-parametric test を用い, 危険率は 5% 以下の場合に有意差ありと判定した。

3 結 果

3・1 健常者における喫煙の影響

Table 3 は健常者の BALF 細胞の分析結果である。NS, LS, HS とも RR に差はなかった。NS の TCN は 9.6×10⁴ 個, その多くが PAM であり (82.4%), Ly は 16.7%, PMN は 0.9% であった。Ly の分画は CD3⁺ 細胞が 81.5%, CD19⁺ 細胞が 2.4% で, T 細胞が大部分であった。喫煙が高度の群ほど TCN は増加を認め,

Table 3 BALF cells findings in healthy volunteers

	Non smokers (NS)	Light smokers (LS)	Heavy smokers (HS)
Recovery rate (%)	65.3 ± 9.8	60.9 ± 10.8	64.0 ± 4.5
Total cell number (×10 ⁴ /ml)	9.6 ± 4.1	13.9 ± 10.3	38.5 ± 14.1*
Cell differentiation (%)			
Macrophage	82.4 ± 7.0	86.9 ± 8.6	96.5 ± 1.5*
Lymphocyte	16.7 ± 6.6	12.2 ± 8.8	2.6 ± 1.0*
Polymorphonuclear leukocyte	0.9 ± 0.7	0.9 ± 1.2	1.0 ± 0.6
Lymphocyte subset (%)			
CD3	81.5 ± 8.4	79.4 ± 8.9	85.5 ± 4.0
CD4	48.2 ± 9.5	46.1 ± 11.7	35.4 ± 14.4
CD8	31.5 ± 5.8	33.7 ± 12.3	54.5 ± 14.7*
HLA-DR	11.2 ± 4.1	12.1 ± 7.6	13.9 ± 7.3
CD19	2.4 ± 1.9	3.1 ± 2.4	3.1 ± 1.2
CD4/CD8 ratio	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.8	0.7 ± 0.4*

* : p < 0.01 comparison with NS

特にHSではNSの4倍であった($P<0.01$). LS, HSとも増加の主体はPAMであり, Lyは相対的低下を示した. PAMの増加, Lyの低下はいずれもHSではNSに対し有意差を認めた(いずれも $P<0.01$). リンパ球のサブセットも喫煙の高度の群ほどCD4⁺細胞が低下, CD8⁺細胞が増加を示し, その比はHSで有意に低下した($P<0.01$)が, LSは差を認めなかった. またHLA-DR⁺リンパ球, CD19⁺細胞も三者間で特に差はみられなかった.

3・2 サルコイドーシス患者における喫煙の影響とその特徴

Table 4に示したようにRRに差を認めないが, HV同様に喫煙群でTCNの増加を認め, HSではNSに比べ有意に上昇していた($P<0.01$). また細胞分画では喫煙によりPAMの増加とLyの相対的低下をみ, HSで有意差を示した(いずれも $P<0.01$). T細胞サブセットもHSでCD4⁺細胞の低下とCD8⁺細胞の増加を認め(それぞれ $P<0.05$, $P<0.01$), CD4/CD8比の有意の低下を示した($P<0.01$). HLA-DR⁺リンパ球, CD19⁺細胞は喫煙による相違は見られなかった.

3・3 IIP患者における喫煙の影響とその特徴

Table 5はIIPでの結果である. HSでRRの低下とTCNの増加をみ, いずれも有意差を認めた($P<0.05$). 細胞分画ではPAMの増加傾向とLyの低下傾向をみた

が有意差は得られなかった. T細胞サブセット, CD4/CD8比, HLA-DR⁺リンパ球, CD19⁺細胞ともにNS, HS間で差は認めなかった.

3・4 喫煙の程度別に分けた場合の疾患群の特徴

上述の結果をHVと比較分析すると, TCNの増加, PAMの低下, Lyの増加, CD4/CD8比の高値, およびHLA-DR⁺リンパ球の増加がSARのBALF所見中の特徴である. 同様にIIPではRRの低下, TCNの増加, PAMの低下, LyおよびPMNの増加, CD4/CD8比の上昇, HLA-DR⁺リンパ球の高値が特徴的である. これらBALF所見をSARとHV, IIPとHVについて喫煙の程度別に比較した. 増加が特徴的なBALF所見(TCN, Ly, PMN, CD4/CD8比, HLA-DR⁺リンパ球)はHVのmean+2S.D.以上を, 低下が特徴的なBALF所見(RR, PAM)はHVのmean-2S.D.未満をとる症例の割合をBALF所見陽性率としてTable 6に示した. SARではNS, LS, HSともCD4/CD8比は80%以上の陽性率であった. TCN, PAM, LyはNSで50%以上であったが, 喫煙群ほど低下を示した. IIPのNSはPMNが60%であったが, 他は50%以下であった. それに対しHSはRR, PAM, Ly, PMN, CD4/CD8比とも高い陽性率を示した.

Table 4 BALF cells findings in patients with pulmonary sarcoidosis

	Non smokers (NS)	Light smokers (LS)	Heavy smokers (HS)
Recovery rate (%)	65.1±11.9	63.6± 8.9	63.7± 5.8
Total cell number (×10 ⁴ /ml)	18.5± 1.0	23.6± 1.0	31.0± 1.4*
Cell differentiation (%)			
Macrophage	56.7±15.2	64.0±18.9	87.9±12.8*
Lymphocyte	41.9±14.8	34.9±18.2	11.6±12.9*
Polymorphonuclear leukocyte	1.4± 1.8	1.1± 1.3	0.4± 0.6
Lymphocyte subset (%)			
CD3	88.1± 5.7	89.1± 7.0	84.8±10.5
CD4	68.7± 9.9	71.6± 8.6	54.6± 7.4**
CD8	15.8± 6.1	15.3± 8.1	31.7±10.6*
HLA-DR	27.6±12.9 (n=20)	33.6±19.5 (n=8)	26.7±16.8 (n=2)
CD19	2.1± 1.1 (n=20)	2.3± 1.2 (n=8)	2.1± 1.1 (n=2)
CD4/CD8 ratio	5.2± 2.6	5.6± 2.1	1.9± 0.7*

*: $p<0.01$ comparison with NS

** : $p<0.05$ comparison with NS

Table 5 BALF cells findings in patients with idiopathic interstitial pneumonia

	Non smokers (NS)	Heavy smokers (HS)
Recovery rate (%)	52.6±10.9	41.7± 7.8**
Total cell number (×10 ⁴ /m ^l)	16.9± 8.5	28.9±13.3**
Cell differentiation (%)		
Macrophage	76.1± 8.9	82.3±12.3
Lymphocyte	17.6±10.3	13.4±12.4
Polymorphonuclear leukocyte	6.3± 8.8	4.2± 4.9
Lymphocyte subset (%)		
CD3	82.5± 5.8	82.1±10.8
CD4	46.2± 6.1	47.7±18.8
CD8	33.8± 7.4	31.4±17.0
HLA-DR	26.0±15.3	29.0±16.9
CD19	3.3± 2.2	3.5± 4.3
CD4/CD8 ratio	1.4± 0.4	2.36± 2.07

** : p<0.05 comparison with NS

Table 6 Percent of cases having positive BALF findings

A

	TCN*	PAM**	Ly*	CD4/CD8*	HLA-DR*
NS	50.0	75.0	75.0	91.7	75.0
LS	16.7	41.7	41.7	83.3	50.0
HS	0	40.0	40.0	80.0	50.0

B

	RR**	TCN*	PAM**	Ly*	PMN*	CD4/CD8*	HLA-DR*
NS	20.0	40.0	0	20.0	60.0	0	40.0
HS	85.7	0	78.6	71.4	50.0	57.1	35.7

A: Pulmonary sarcoidosis B: Idiopathic interstitial pneumonia

BALF cells findings of patients were compared with those of HV in terms of smoking degree.

*: These factors are judged positive if the value is higher than that of HV's mean+2S. D.

**: These factors are judged positive if the value is lower than that of HV's mean-2S. D.

3・5 SARにおける活動性とBALF細胞所見との比較

3・5・1 S-ACE との比較

SAR患者を活動性の指標の一つとされているS-ACEが正常域の群(I)と上昇している群(II)に分け、3・4で得たSARに特徴的なBALF細胞所見、即ちTCN, Ly, CD4/CD8比, HLA-DR⁺リンパ球の割合と比較した(Fig. 1). TCNはLSでII群の有意な高値(P<0.05)とHSで高い傾向をみた。Lyの割合もLSでII群が有意に高値であった(P<0.05)。CD4/CD8比はNS, LS, HSとも有意差を得なかったが、Table 7に示すようにCD4/CD8比が5.0以上の群と5.0未満の

群に分けるとNSではII群はCD4/CD8比高値例を有意に多く含んでいた(P<0.05)。またHLA-DR⁺リンパ球はNS, LSともにII群で有意に高値であった(各々P<0.01, P<0.05)。

3・5・2 症状の有無との比較¹⁹⁾

SARの病態が活動的な場合、症状を有することが多い。このため何らかの呼吸器症状(息切れ、咳嗽)ないし全身症状(発熱、関節痛、全身倦怠)がある群(II)とない群(I)とに分け、BALF細胞所見と比較した(Fig. 2)。TCN, CD4/CD8比は有意差の得られたものはないが、Lyの割合はLSで高値であり(P<0.05)。

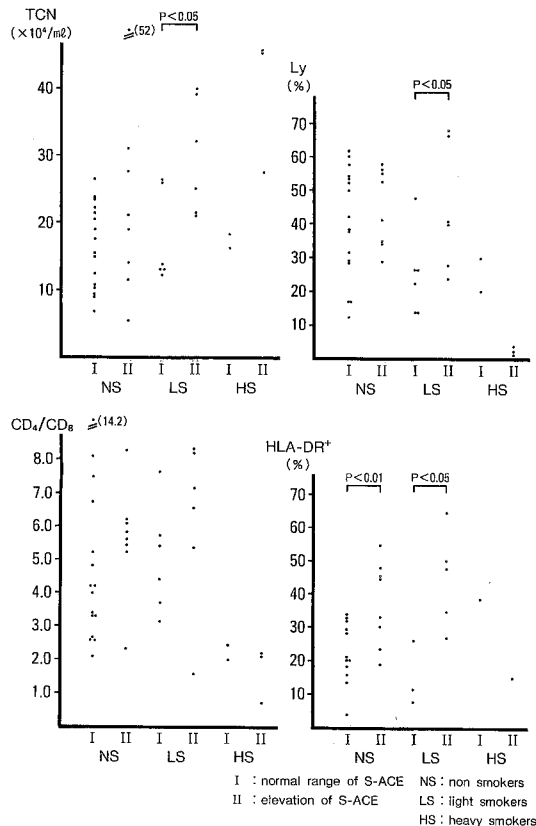


Fig. 1 Comparison between BALF cells findings and the activity of S-ACE.

Table 7 Comparison between CD4/CD8 ratio and S-ACE

A)		
	5.0 >	5.0 ≤
I	11	5
II	1	7
p=0.014		
B)		
	5.0 >	5.0 ≤
I	3	3
II	1	5
p=0.27		

A: All these cases are non smokers.
 B: All these cases are light smokers.
 I: normal range of S-ACE
 II: elevation of S-ACE

HLA-DR⁺ リンパ球はNS, LSともに有意に高値であった (いずれも $P < 0.01$).

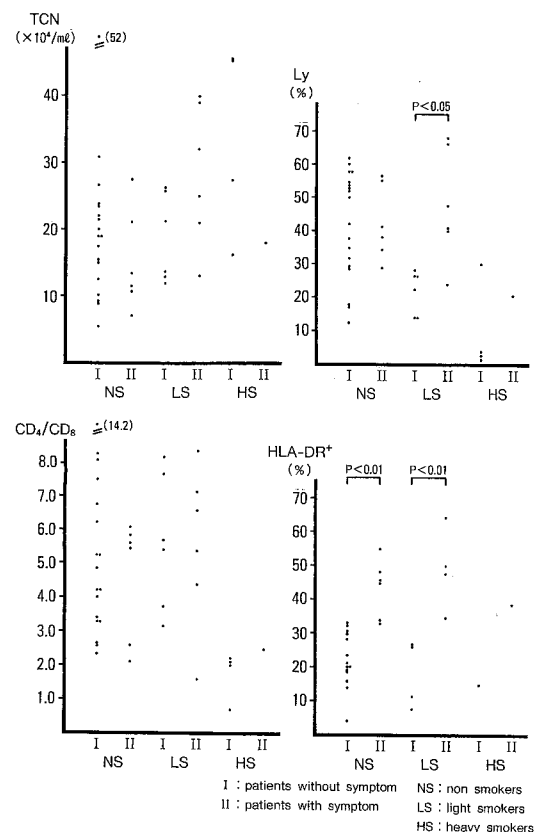


Fig. 2 Comparison between BALF cells findings of patients with or without symptoms.

Of the 13 patients in group II, cough was seen in 10 cases, dyspnea in 2, and systemic symptoms such as fever, weakness and arthralgia in 6.

3・6 HLA-DR⁺ リンパ球数と CD4⁺ ならびに CD8⁺ 細胞数との相関

2・2・2・4で示した方法で HLA-DR⁺ リンパ球数, CD4⁺ および CD8⁺ 細胞数を求め, HLA-DR⁺ リンパ球数と CD4⁺ 細胞数との相関係数 r_4 , ならびに HLA-DR⁺ リンパ球数と CD8⁺ 細胞数との相関係数 r_8 を求めた. 症例数の関係で SAR の HS と LS を一括した. SAR においては NS, LS+HS ともに r_4 が極めて高値であったが, IIP は r_4 , r_8 ともに高値であった (Table 8). また相関係数の二乗である寄与率を比較すると, SAR においては r_4^2 と r_8^2 の差は IIP のそれより明らかに大きかった.

3・7 BALF 細胞における 2', 5' AS の測定

Fig. 3に SAR, IIP, HV の BALF 細胞の 2', 5' AS 値を示した. 縦軸は対数目盛りで表示した. BALF 細胞の 2', 5' AS 値は SAR, IIP, HV の順に $241.2 \pm$

Table 8 Coefficient of correlation and coefficient of determination between the numbers of T cell subsets and the numbers of HLA-DR positive lymphocytes

	r_4	r_8	r_4^2	r_8^2
Sarcoidosis				
NS (n=20)	0.883	0.712	0.780	0.507
LS+HS (n=10)	0.953	0.780	0.908	0.608
IIP				
NS (n=5)	0.918	0.988	0.843	0.976
HS (n=14)	0.827	0.909	0.684	0.826

r_4 means coefficient of correlation between numbers of CD4 positive cells and HLA-DR positive lymphocyte.

r_8 means coefficient of correlation between numbers of CD8 positive cells and HLA-DR positive lymphocyte.

188.0, 82.4 ± 68.3 , 83.3 ± 35.1 であり, SARはIIP, HVいずれのBALF細胞の2', 5' AS値より有意に高かったが, IIPとHVでは差を認めなかった. 今回の探索の目的である喫煙の影響について, 上記の疾患においては喫煙者, 非喫煙者で差を認めなかった.

4 考 察

BALは気管支肺泡領域の細胞を採取, 分析する検査であるが, この際生食を注入, 回収する操作について施設間で一致した方法はない. 著者らは50 ml, 4回法が最適であると以前報告した¹⁵⁾. 全国的にも50 ml, 3回ないし4回で行っている施設が大部分である. また細胞分画標本はリンパ球比率を最も正確に算定するとされるフィルター法を用いた^{16,17)}.

一般臨床においてBALF細胞の分析は疾患の活動度, 予後の推測, 治療方針の決定に役立てようとする方向にあるが, その際基本になるのは健常者のBALF細胞の分析である. そこでHVをNS, LS, HSに分け喫煙の影響を詳細に分析し, 次いで間質性肺疾患としてSAR, IIPのBALF細胞の特徴を比較, 検討した.

4.1 健常者でのBALF細胞所見

健常者でのRRの平均は60%台であり, 他の報告^{1,20,21)}と差はなかった. 非喫煙者のTCNは 9.6×10^4 個, その大部分がPAMであった(82.4%). Lyは16.7%でその内T細胞が81.5%で, B細胞は2.4%, またPMNは0.9%であり, 末梢血とは異なったプロフィールを示した.

喫煙の高度の群ほどTCNの増加, PAM比率の増加とLy比率の相対的減少を示した. リンパ球サブセットも喫煙により, CD4/CD8比がHSでNSに対し有意に

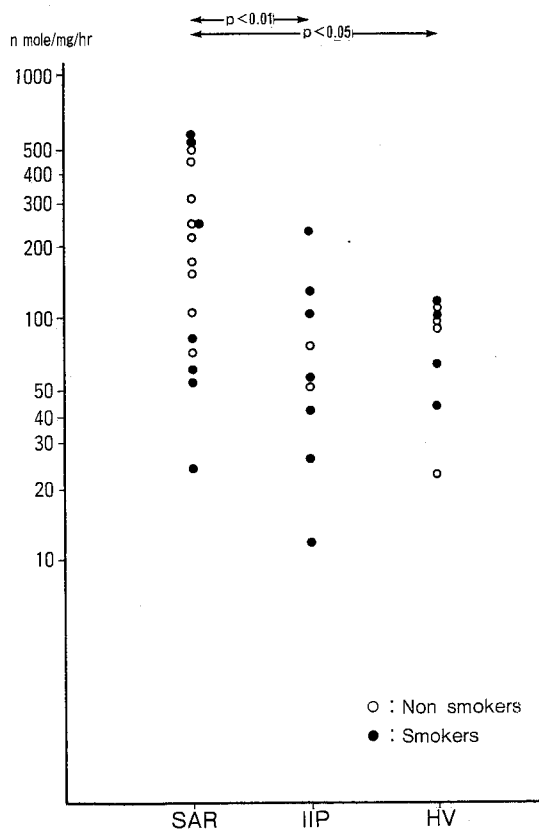


Fig. 3 2', 5' AS activity in BALF cells from SAR patients, IIP and HV.
The activity of 2', 5' AS in BALF cells of SAR, IIP and HV were 241.2 ± 188.0 , 82.4 ± 68.3 and 83.3 ± 35.1 respectively.

低下し, 泉¹⁰⁾, Costabel らの報告¹¹⁾と一致したが, NS, LS 間では差を認めず, 軽度の喫煙は T 細胞サブセット比に影響をおよぼしにくいと考えられた。

4.2 サルコイドーシスでの BALF 細胞所見

SAR は肺組織に肉芽腫形成をきたす疾患であり, BALF 細胞所見ではリンパ球比率の増加と CD4/CD8 比の上昇が特徴とされる^{3,4)}。また喫煙によりリンパ球比率が低下することも報告されている²²⁻²⁴⁾が, T 細胞サブセットについての報告は少なく, 影響を与えないとの報告もある²⁶⁾。著者の結果も非喫煙者の BALF 所見では TCN が増加し, その主体は PAM (56.7%) と Ly (41.9%) であった。増加したリンパ球は T 細胞であり, HV に比べ CD4⁺ 細胞の増加, CD8⁺ 細胞の低下をみ, 結果として CD4/CD8 比は増加した。喫煙者では TCN と細胞分画は健常者の場合と同様に, TCN の増加と Ly 比率の減少を起し, 一日の喫煙本数の多い群ほどその傾向が明らかであった。CD4⁺ 細胞の低下, CD8⁺ 細胞の増加はそれぞれ HS は NS に対し有意差は認めたが (各々 $P < 0.05$, $P < 0.01$), LS は差を認めなかった。また CD4/CD8 比も HS 群では非喫煙群に比べ有意に低下していたが, NS, LS 間ではその値に差を認めなかった。Lawrence²⁵⁾ は SAR の BALF 細胞の分析で CD4/CD8 比は喫煙の影響を受けないと泉¹⁰⁾とは異なる報告をしている。この原因としてかなり高度喫煙者でなければ T 細胞サブセット比にまで影響をおよぼさないという著者の結果がその可能性の一つとして考えられる。

Table 6 から NS では TCN, PAM, Ly, CD4/CD8 比, HLA-DR⁺ リンパ球にいたるまで HV と大きな差異を高率に認めたが, 高度喫煙群ほど陽性率は低下している。胸部 X 線所見, S-ACE 値上差のない SAR が, このように BALF 所見の陽性率に差をみたことは, SAR においては高度喫煙群ほど BALF に反映される特徴的な所見が得られ難いことを示す。リンパ球は高率に HLA-DR 抗原が陽性であった。HLA-DR 抗原は活性化 T 細胞のマーカーであり, Ia 様抗原ともいわれ^{26,27)}, B 細胞にも存在している。しかし Table 3~5 にみるように BALF 中の大多数のリンパ球が T 細胞で B 細胞がほとんどないことから HLA-DR⁺ リンパ球比率をもって活性化 T 細胞の比率と考えてよいと思われる。SAR において活性化 T 細胞は monocyte chemotactic factor, leukocyte inhibitory factor の分泌等, その病変形成において重要な役割を担っており^{4,7)}, HLA-DR⁺ リンパ球の増加はそれらの報告を支持するものと言える。Table 8 から HLA-DR⁺ リンパ

球と CD4⁺ 細胞ならびに CD8⁺ 細胞各々の絶対数との相関係数 r_4 , r_8 は, それぞれ NS では 0.88 と 0.71, LS+HS では 0.95, 0.78 と r_4 が, r_8 より十分大きい。また相関係数の二乗である寄与率でみると NS では r_4^2 は 0.78, r_8^2 は 0.51, LS+HS では各々 0.91 と 0.61 となり, 活性化 T 細胞の多くは CD4 抗原も陽性であると考えられた。

SAR の活動性の評価に関連した BALF 所見としては, Hunninghake ら^{28,29)} はリンパ球比率が, Costabel¹⁹⁾ は, CD4/CD8 比が有用としている。しかしながら Table 4 にみるように, リンパ球比率, CD4/CD8 比とも喫煙の影響を受ける。著者は S-ACE 値と自覚症の有無を活動性の指標として検討した (Fig. 1, 2)。リンパ球比率は軽度喫煙群 (LS) で S-ACE 高値群に有意の増加を認め, 自覚症状を有する例にも高値であった。CD4/CD8 比は Fig. 1 では有意差は得られなかったが, Table 7 に示すように CD4/CD8 比が 5 以上の高値を認めた例は, S-ACE 上昇群では NS, LS は各々 7/8, 5/6 で, これは S-ACE 正常群での NS, LS 各々 5/16, 3/6 に比べ高率であり, 特に NS では有意に高率であった。また TCN も LS の S-ACE 高値群に増加を認めたが, NS では差を認めなかった。しかしながら HLA-DR⁺ リンパ球は NS, LS 共に S-ACE, 自覚症の有無の両検討でも有意差を認め, さらに HLA-DR⁺ リンパ球が喫煙の影響を受けないことから SAR の活動性の評価に最も有用であると考えられた。

4.3 IIP での BALF 細胞所見

IIP は慢性進行性の疾患であり, 含気減少, honey comb 変化を呈するのが特徴³⁰⁾で, その影響が RR の低下として表れている。健常人でも RR は高齢者で低下するがその場合でも 57%程度は得られ³¹⁾, 著者の結果は年齢の影響を考慮しても RR は低下しており, 疾患の一つの特徴と考えられた。高田ら³²⁾は喫煙は非喫煙の肺腺癌に比べ気腫化傾向を引き起こすと報告しており, RR で HS が NS より低下しているのはそのためと考えられる。TCN は NS, HS 間で有意差を示しこれは HV, SAR と同様であった。

PAM は HS 群でその平均値は増加, Ly は低下を示したが有意差は得られなかった。CD4⁺ 細胞, CD8⁺ 細胞の割合ならびに CD4/CD8 比も NS, HS 間で差を認めず, この点 IIP は SAR と異なり喫煙の影響が細胞分画ならびに T 細胞サブセット上に表れにくい疾患といえる。一方 IIP の診断における BAL の有用性については, NS は Table 6 で陽性率は PMN の項目が 60%を示した以外, 他は低値であった。それに対し HS は RR

とPAMならびにLy, PMN, CD4/CD8比の項目において、高い陽性率を示した。TCN, PMN, HLA-DR⁺リンパ球の項目がNSに比べ陽性率は低下しているものの、全体としてみるとSARと異なりHSの群においてBALの診断能が高いと考えられた。

IIPの成立機序にはB細胞の抗体産生能亢進が免疫複合体を肺胞隔壁に沈着させ、それによりマクロファージが活性化され、好中球の病変部位への集積と好中球から放出される各種の分解酵素による組織障害とそれに続く線維化の過程が想定されている⁴⁾。このB細胞の免疫グロブリン細胞への分化に活性化T細胞からのBCDF (B cell differentiation factor) が関与するとされ³³⁾、HLA-DR⁺リンパ球高値はそれら活性化リンパ球を反映している可能性がある。しかしながらTable 8からHLA-DR⁺リンパ球数とCD4⁺細胞、ならびにCD8⁺細胞の絶対数との相関係数、寄与率とも大きな差はなく、活性化T細胞はCD4陽性のものばかりでなくCD8陽性のものも多く存在していると考えられた。

4.4 BALF細胞中の2', 5' ASの測定について

2', 5' ASはIFNにより細胞内に誘導される酵素でその値はIFNの力価を反映するとされる¹⁴⁾。IFNは半減期の短いこと、低濃度であることからその同定は困難であるが、2', 5' ASはその感度の良さ、測定の簡便性が大きな利点である¹⁴⁾。健康人末梢血単核球層から得た細胞の2', 5' ASは20 n mole/mg/hr以下との報告が多い³⁴⁻³⁷⁾。SAR³⁴⁻³⁷⁾、IIP^{35,36)}のほかSLE³⁷⁻³⁹⁾、ベーチェット病等^{34,39)}でも末梢血単核球の2', 5' ASは上昇しているとされ、これら疾患の病因にIFN-2', 5' AS system^{34,40)}が関わっているとの考えもある。BALF細胞の2', 5' AS値はSAR, IIP, HVとも極めて高く、特にSARはIIP, HVに比べても有意に高値であった。この結果は気管支肺胞領域のIFNの存在を意味し、RobinsonらのSAR患者のBALF細胞のIFN産生の報告¹²⁾、IIP患者のBALF細胞からのIFNの産生の報告¹³⁾を間接的ながら支持するものである。しかしSAR, IIP, HVとも喫煙による2', 5' AS値に差を認めず、喫煙はIFN産生に影響していないと考えられた。

要 約

1 健康者(HV)、肺サルコイドーシス(SAR)、特発性間質性肺炎(IIP)ともBALF細胞所見に喫煙の影響を認めた。HV, SARとも高度喫煙者(HS)で総細胞数(TCN)の増加、肺胞マクロファージ(PAM)の増加、リンパ球(Ly)の低下ならびにCD4/CD8比の低下は非喫煙者(NS)と有意差を認めた。しかしなが

らHV, SARにおいて軽度喫煙者(LS)とNSでは有意差を認めたものはなかった。IIPはHSにおいて回収率(RR)とTCNのみ有意の低下ならびに上昇を認めた。

2 喫煙の程度別にSAR, IIPのBALF細胞所見をHVと比較した。TCN, Ly, HLA-DR⁺リンパ球, CD4/CD8比がHVのmean+2S.D.以上を、PAMはHVのmean-2S.D.未満であった症例の割合をSARのBALF細胞所見陽性率とした。TCN, Ly, 多核型白血球(PMN), HLA-DR⁺リンパ球, CD4/CD8比がHVのmean+2S.D.以上およびRR, PAMがHVのmean-2S.D.未満であった症例の割合をIIPのBALF細胞所見陽性率とした。その結果、喫煙群ほどSARは陽性率が低下し、IIPでは逆に陽性率が高くなる項目が増加した。

3 SARでS-ACEと症状の有無を活動性の指標とすると、BALF細胞所見でTCN, Ly, CD4/CD8比よりもHLA-DR⁺リンパ球の割合が活動性を最も良く反映した。

4 SARではHLA-DR⁺リンパ球の多くはCD4陽性であることが考えられたが、IIPはCD8陽性のものも数多く存在していると考えられた。

5 BALF細胞の2', 5' oligoadenylate synthetase活性はHVに比較して、SARでは有意に高値であったが、IIPとHVでは差を認めなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導いただいた本学内科学第3講座、鈴木明教授、微生物学講座、小熊恵二教授に深謝いたします。また研究に際し、御教示、御助言をいただいた、内科学第3講座、浅川三男助教授、名取博助教授ならびに微生物学講座、藤井暢弘助教授に深謝します。また、御協力いただいた教室員各位に感謝いたします。

文 献

1. Reynolds, H. Y. and Newball, H. H.: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J. Lab. Clin. Med.* 84, 559-573 (1974).
2. Ginns, L. C., Goldenheim, P. D., Burton, R. C., Colvin, R. B., Miller, L. G., Goldstein, G., Hurwitz, C. and Kazemi, H.: T-lymphocyte subsets in peripheral blood and lung lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis: Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Clin*

- Immunol. Immunopath.** **25**, 11-20 (1982).
3. 三上正志, 雨夜和俊, 三觜 雄, 小笹晃太郎, 鈴木明: 呼吸器疾患におけるBALF細胞分析の診断能と意義. **日胸疾会誌** **25**, 99-105 (1987).
 4. Crystal, R. G., Gadek, J. E., Ferrans, V. J., Fulmer, J. D., Line, B. R. and Hunninghake, G. W.: Interstitial lung disease: Current concept of pathogenesis, staging and therapy. **Am. J. Med.** **70**, 542-568 (1981).
 5. 雨夜和俊, 三上正志, 三觜 雄, 能登屋久志, 浅川三男, 名取 博, 鈴木 明: 呼吸器疾患における気管支肺胞洗浄液中活性化Tリンパ球の研究. **気管支学** **8**, 710-721 (1987).
 6. 雨夜和俊, 三上正志, 三觜 雄, 立野史樹, 平井英幸, 名取 博, 浅川三男, 鈴木 明: 農夫肺, 加湿器肺7例における気管支肺胞洗浄細胞の検討. **日胸疾会誌** **26**, 1235-1242 (1988).
 7. Costabel, U., Bross, K. J., Ruhle, K. H., Lohr, G. W. and Matthys, H.: Ia-like antigens on T-cells and their subpopulations in pulmonary sarcoidosis and in hypersensitivity pneumonitis. **Am. Rev. Respir. Dis.** **131**, 337-342 (1985).
 8. Daniele, R. P., Dauber, J. H., Altose, M. D., Rowlands, D. T. and Gorenberg, D. J.: Lymphocyte studies in asymptomatic cigarette smokers: A comparison between lung and peripheral blood. **Am. Rev. Respir. Dis.** **116**, 997-1005 (1977).
 9. Warr, G. A., Martin, R. R., Holleman, C. L. and Criswel, B. S.: Classification of bronchial lymphocytes from nonsmokers and smokers. **Am. Rev. Respir. Dis.** **113**, 96-100 (1976).
 10. 泉 孝英, 長井苑子, 竹内 実, 北市政則, 渡辺和彦, 大島駿作, 沢野哲重, 三尾直士, 橋本圭司: 喫煙の健常人およびサルコイドーシス症例におけるBALF細胞所見に及ぼす影響に関する検討. **日胸疾会誌** **24** (増刊号): 151 (1986).
 11. Costabel, U., Reuter, C., Bross, K. J., Ruhle, K. H. and Matthys, H.: Alterations in immunoregulatory T cells in smoking are more pronounced in bronchoalveolar lavage fluid than in blood. **Am. Rev. Respir. Dis.** **129**: A17 (1984).
 12. Robinson, B. W. S., McLemore, T. L. and Crystal, R. G.: Gamma interferon is spontaneously produced by lung T-lymphocytes and alveolar macrophages in patients with pulmonary sarcoidosis. **J. Clin. Invest.** **75**, 1488-1495 (1985).
 13. 山本正彦, 高田勝利, 森下宗彦, 吉川公章, 佐道理文, 浅井 学, 荒川哲基: 特発性間質性肺炎のBALFリンパ球のIL-2および γ インターフェロン産生能. **間質性肺疾患調査研究班雑誌** **59**, 71-76 (1984).
 14. Schattner, A., Merlin, G., Wallach, D., Rosenberg, H., Bino, T., Hahn, T., Levin, S. and Revel, M.: Monitoring of interferon therapy by assay of (2', 5') oligoadenylate synthetase in human peripheral white blood cells. **J. Interferon Res.** **1**, 587-594 (1981).
 15. 三上正志, 能登屋久志, 雨夜和俊, 三觜 雄, 高橋弘毅, 森 雅樹, 名取 博, 黒木由夫, 秋野豊明, 鈴木明: BALの標準的洗浄法に関する検討. **気管支学** **8**, 218-228 (1986).
 16. 三上正志, 能登屋久志, 雨夜和俊, 三觜 雄, 小笹晃太郎, 名取 博, 浅川三男, 鈴木 明: BALF細胞成分分析法におけるフィルター法の有用性. **呼吸** **5**, 328-336 (1986).
 17. Saltini, C., Hance, A. J., Ferrans, V. J., Basset, F., Bitterman, P. B. and Crystal, R. G.: Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. **Am. Rev. Respir. Dis.** **130**, 650-658 (1984).
 18. 細田 裕, 橋本 勉, 三上理一郎, 長山英男, 新津泰孝, 戸井田一郎, 岡部哲朗, 藤沢道夫, 鳥井義夫, 山本正彦, 立花暉夫, 上田英之助, 小高 稔: サルコイドーシスにおける血清ACE測定法に関する研究—笠原法の実用性に関する検討—. **日本医事新報**, 3082, 21-25 (1983).
 19. Costabel, U., Bross, K. J. and Matthys, H.: Pulmonary sarcoidosis: Assessment of disease activity by lung lymphocyte subpopulations. **Klin. Wochenschr.** **61**, 349-356 (1983).
 20. Bell, D. Y., Haseman, J. A., Spock, A., McLennan, G. and Hook, G. E. R.: Plasma proteins of the bronchoalveolar surface of the lungs of smokers and nonsmokers. **Am. Rev. Respir. Dis.** **124**, 72-79 (1981).
 21. Morgan, J. E., McCaul, S., Rodriguez, F. H., Abernathy, D., de Shazo, R. D. and Banks, D. E.: Pulmonary immunologic features of alveolar septal amyloidosis associated with multiple myeloma. **Chest** **92**, 704-708 (1987).
 22. Arnoux, A., Mansac, J., Stanislas-Leguerin, G., Huchon, G. and Chretien, J.: Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis: Correlation between alveolar lymphocytosis and clinical data. **Path. Res. Pract.** **175**, 62-79 (1982).
 23. Leuenberger, Ph., Vonmoos, S. and Vejdovsky, R.: Morphologic changes of alveolar macrophages in smoking sarcoidosis patients. **Eur. J. Respir. Dis.** **66** (Suppl. 139) 72-75 (1985).
 24. Rossman, M. D., Danber, J. H., Cardillo, M. E. and Daniele, R. P.: Pulmonary sarcoidosis: Correlation of serum angiotensin-converting enzyme

- with blood and bronchoalveolar lymphocytes. *Am. Rev. Respir. Dis.* **125**, 336-369 (1982).
25. Lawrence, E. C., Fox, T. B., Teague, R. B., Bloom, K. and Wilson, R. K.: Cigarette smoking and bronchoalveolar T cell populations in sarcoidosis. *Ann. NY Acad. Sci.* **465**, 657-664 (1986).
 26. Reinherz, E. L., Kung, P. C., Pesando, J. M., Ritz, J., Goldstein, G. and Schlossman, S. F.: Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody: Activation stimuli required for expression. *J. Exp. Med.* **150**, 1472-148 (1979).
 27. Ceuppens, J. L., Goodwin, J. S. and Searles, R. P.: The presence of Ia antigen on human peripheral blood T cells and T-cell subsets: Analysis with monoclonal antibodies and the fluorescence-activated cell sorter. *Cell. Immunol.* **64**, 277-292 (1981).
 28. Hunninghake, G. W. and Crystal R. G.: Pulmonary sarcoidosis: A disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activating at sites of disease activity. *N. Engl. J. Med.* **305**, 429-434 (1981).
 29. Keogh, B. A., Hunninghake, G. W., Line, B. R. and Crystal, R. G.: The alveolitis of pulmonary sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **128**, 256-265 (1983).
 30. 加藤誠也, 小楊弘之, 鈴木 明: 特発性間質性肺炎とCT. *Geriatr. Med.* **25**, 361-366 (1987).
 31. The Bal Cooperative Group Steering Committee: Bronchoalveolar lavage constitutes in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**, 169-202 (1990).
 32. 高田一男, 佐藤 忍, 池田英樹, 長内和宏, 諏訪部章, 中村秀範, 高橋敬治, 安井昭二: プレオマイシン実験肺線維症に対する喫煙の影響. *呼吸と循環* **36**, 423-427 (1988).
 33. 江村正仁: 特発性肺線維症例における B cell growth factor, B cell differentiation factor 産生に関する検討. *日胸疾会誌* **27**, 1467-1474 (1989).
 34. 小竹 聡: 内因性ぶどう膜炎におけるインターフェロンシステムおよび 2', 5' オリゴアデニル酸システムの研究. *北医誌* **63**, 398-407 (1988).
 35. 雨夜和俊, 藤井暢弘, 木村浩一, 小熊恵二, 鈴木明: サルコイドーシスおよび特発性間質性肺炎における気管支肺胞洗浄液中の細胞ならびに末梢血リンパ球中の 2', 5' oligoadenylate synthetase 活性の検討. *医学のあゆみ* **150**, 501-502 (1989).
 36. Amaya, M., Asakawa, M., Suzuki, A. and Ohmiti, M.: Activity of 2', 5' oligoadenylate synthetase of the peripheral blood lymphocyte and bronchoalveolar lavage cells in the patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. The 6th World Congress for Bronchology. 62 (1989).
 37. Fujii, N., Kotake, S., Hirose, S., Ohno, S., Yasuda, I., Sagawa, A., Ishikawa, K. and Minagawa, I.: Oligo-2', 5'-adenylate synthetase activity in peripheral blood mononuclear leukocytes in various disease. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 1216-1218 (1984).
 38. Preble, O. T., Rothko, K., Klippel, J. H., Friedman, R. M. and Johnston, M.: Interferon-induced 2'-5' adenylyl synthetase *in vivo* and interferon production *in vitro* by lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with and without circulating interferon. *J. Exp. Med.* **157**, 2140-2146 (1983).
 39. Hylton, W., Cayley, J., Dore, C. and Denman, A. M.: 2', 5'-Oligoadenylate synthetase induction in lymphocytes of patients with connective tissue diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **45**, 220-224 (1986).
 40. 宗川吉汪, 清水典明, 東雄二郎: インターフェロンと 2-5A システム. *蛋白質核酸酵素* **25**, 209-219 (1981).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第3講座 雨夜和俊